10.22092/sppi.2020.121913

مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۵، شماره ۲، سال ۱۳۹۸

مقایسه رفتار نکروزی و نشت یونی ارقام مقاوم و متحمل گلابی (*Pyrus communis* L.) در برهمکنش با سویه‌های جهش یافته باکتری عامل بیماری آتشک در شرایط درون شیشه

Comparison of Necrotrophic Behaviour and Electrolyte Leakage of Resistant and Tolerant Pear (*Pyrus communis* L.) Cultivars in Interaction with Mutant Strains of Causal Agent of Fire Blight Under *in Vitro* Conditions

روح‌اله مالکی[۱]، حمید عبداللهی[۲] و سعید پیری[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر، ابهر، ایران.
۲- دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر، ابهر، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۵

چکیده

مالکی، ر.، عبداللهی، ح. و پیری، س. ۱۳۹۸. مقایسه رفتار نکروزی و نشت یونی ارقام مقاوم و متحمل گلابی (*Pyrus communis* L.) در برهمکنش با سویه‌های جهش یافته باکتری عامل بیماری آتشک در شرایط درون شیشه. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۵:** ۱۵۲- ۱۳۷.

واکنش ارقام گلابی در مقابل حمله عامل بیماری آتشک به دو صورت مقاومت و تحمل بروز می‌کند که تفاوت آنها به خوبی مشخص نیست. بنابراین رفتار نکروزی و نشت یونی دو رقم مقاوم درگزی و متحمل هاروسوئیت در مقایسه با رقم حساس بارتلت در مقابل سویه غیرجهش یافته و سویه‌های جهش یافته *hrp*N⁻، *dsp*A/E⁻ و *hrp*W⁻ باکتری *E. amylovora* با هدف شناسائی ساختارهای مقاومت و تحمل در شرایط درون شیشه، مورد مقایسه قرار گرفت. ظهور علائم در واکنش با سویه غیرجهش یافته در ارقام حساس و متحمل پس از سه روز و در رقم مقاوم پس از هفت روز ظاهر شد، لیکن در رقم مقاوم سرعت پیشرفت کندتری داشت. در کلیه ارقام یک تا دو روز قبل از مشاهده نکروز، نشت یونی افزایش و به ۷۰ در صد رسید و با کامل شدن نکروز این شاخص به ۱۰۰ درصد افزایش یافت. سویه جهش یافته *hrp*W⁻ تاثیری روی زمان بروز نکروز و نشت یونی نداشت که بیانگر عدم تاثیر آن در ساختارهای مقاومت و تحمل بود. استفاده از سویه *hrp*N⁻ سبب تسریع نکروز و نشت یونی در رقم مقاوم و تاخیر این شاخص‌ها در رقم متحمل در مقایسه با رقم حساس شد. همچنین سویه *dsp*A/E⁻ سبب تسریع نسبی نکروز و نشت یونی به مدت ۴۸ ساعت در رقم مقاوم در مقایسه با رقم متحمل و عدم بروز کامل علائم در رقم حساس شد. بر اساس نقش دوگانه پروتئین HrpN روی بیماری‌زائی و تحریک سامانه دفاعی میزبان، نتایج بیانگر نقش کلیدی آن روی سامانه دفاع اکتسابی نسبت به نقش بیماری‌زائی آن در رقم مقاوم درگزی، و رابطه معکوس آن در رقم متحمل هاروسوئیت بود. این رفتار دوگانه می‌تواند به عنوان مسیری برای شناخت عمیق‌تر ساختار مقاومت به آتشک در این گلابی و همچنین شاخصی برای تمایز ارقام مقاوم از متحمل گلابی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: گلابی، سویه جهش یافته، دفاع اکتسابی، مقاومت، تحمل.

نگارنده مسئول: h.abdollahi@areeo.ac.ir تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱

مقدمه

بیماری آتشک با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار شامل سیب، گلابی و به در جهان است و همه ساله خسارت زیادی را به این گروه از درختان میوه بخصوص به و گلابی در مناطق کشت و پرورش این محصولات وارد می‌کند (Abdollahi *et al*., 2004). این باکتری از نوع میله‌ای و گرم منفی بوده و تاکنون هیچیک از روش های کنترل و مبارزه با آن به طور قطعی موثر نبوده است (Vanneste, 2000). از جمله راه‌های کنترل عامل بیماری آتشک می‌توان به استفاده از ترکیبات شیمیایی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات مسی، از بین بردن بافت‌های آلوده، کاربرد روش‌های بهباغی و استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل اشاره کرد (Van der Zwet and Keil, 1979). بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از ارقام متحمل یا مقاوم به بیماری آتشک موثرترین و اقتصادی‌ترین روش مبارزه با این بیماری می‌باشد (Vanneste, 2000).

واکنش گیاهان غیرمیزبان نظیر آرابیدوپسیس و توتون به آلوده‌سازی با باکتری *E. amylovora* به صورت فوق حساسیت (Hypersensitive Response = HR) گزارش شده است (Venisse *et al*., 2001). علاوه بر واکنش فوق حساسیت که به صورت مقاومت کامل بافت در برهمکنش غیرسازگار (Incompatible interaction) بروز می کند، سطوح متفاوتی از مقاومت به بیماری نیز در میزبان‌های باکتری در برهمکنش سازگار (Compatible interaction) گزارش شده است (Holtappels *et al*., 2018). از طرفی، تحقیقات نشانگر این است که در هر دو برهمکنش سازگار و غیرسازگار عامل بیماری با بافت‌ها، تولید گونه های فعال اکسیژن و ایجاد انفجار اکسیداتیو (Oxidative burst) از پاسخ‌های آشکار به حمله باکتری عامل بیماری آتشک است (Venisse *et al*., 2001).

باکتری *E. amylovora* به منظور ایجاد بیماری در میزبان یا واکنش فوق حساسیت در گیاهان غیر میزبان اقدام به تولید سه نوع پروتیئن موثره (Effector protein) شامل پروتئین‌های HrpN، DspA/E و HrpW می نماید (Narayanasamy, 2008). این پروتیئن‌های موثره از یک خوشه ژنی در ژنوم باکتری با طول حدود ۶۲ کیلوباز تولید می‌شود که دربردارنده ژن‌های *hrp*، *hrc* و *dsp* می‌باشند. در این بین، دو پروتئین موثره HrpN و HrpW توسط ژن‌های *hrp* و پروتئین موثره *Dsp*A/E توسط ژن های *dsp* تولید می شوند (Oh and Beer, 2005). از میان سه پروتئین موثره فوق، دو پروتئین HrpN و DspA/E به عنوان گزینه‌های اصلی برهمکنش سازگار و ایجاد بیماری در میزبان بیان شده‌اند و ظاهراً پروتئین HrpW نقش ناچیزی در این برهمکنش دارد (Taheri Shahrestani *et al*., 2017).

تحقیقات اخیر نشان داده است که برای تأثیر پروتئین HrpN روی میزبان وجود کلروپلاست‌های فعال ضروری است. این مطلب نشان‌دهنده این است که از بین پروتئین‌های مؤثره باکتری، HrpN می‌تواند اصلی‌ترین مؤلفه برهمکنش باکتری با کلروپلاست‌های میزبان باشد که با نقش‌های گزارش شده آن در مقاومت و تحریک سامانه دفاع اکتسابی سیستمیک نیز منطبق است (Taheri Shahrestani *et al.*, 2017). همچنین عبدالهی و همکاران (Abdollahi *et al.*, 2004) شواهدی را مبنی بر تاثیر پروتئین‌های موثره بر زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست ارائه دادند.

پروتئین HrpN در گیاه غیر میزبان باعث واکنش فوق حساسیت، تخریب عملکرد میتوکندریایی و در نتیجه مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود (Xie and Chen, 2000). همچنین، پروتئین DspA/E برای بیماری‌زایی باکتری *E. amylovora* ضروری تشخیص داده شده است و مشخص شده سویه‌های *dsp*A/E⁻ دارای توانایی بیماری‌زایی نبوده و قادر به رشد در گیاه میزبان نیستند. پروتئین موثره DspA/E، به عنوان یک عامل پاتوژنیک در باکتری *E. amylovora* شناخته شده است، زیرا موتانت‌های *dsp*A/E⁻ باعث ایجاد بیماری در شاخه‌های سیب و میوه و نهال گلابی نشدند (Bogdanove *et al.*, 1998; Gaudriault *et al.*, 1997).

ونیسه و همکاران (Venisse *et al.*, 2003) گزارش کردند که نقش توام دو پروتئین موثره HrpN و DspA/E سبب ایجاد انفجار اکسیداتیو در برهمکنش باکتری با گونه‌های میزبان می‌شود. همچنین آذرآبادی و همکاران (Azarabadi *et al.*, 2017) گزارش دادند که تحمل به بیماری آتشک با تغییر در الگوی تولید گونه‌های فعال اکسیژن و به ویژه تاثیر دو گونه پراکسیدهیدروژن و هیدروکسیل در بافت‌های میزبان مرتبط می‌باشد. بنابراین با توجه به نقش کلیدی پروتئین موثره DspA/E در فرآیند برهمکنش با میزبان و تولید گونه های فعال اکسیژن، سطح تاثیر این پروتئین موثره و همچنین واکنش‌های دفاعی اندامک‌های درگیر در تولید گونه‌های فعال اکسیژن، می‌تواند تعیین کننده سطح مقاومت میزبان به بیماری آتشک باشد.

از سوی دیگر بررسی دبروی و همکاران (DebRoy *et al.*, 2004) با استفاده از موتانت *dsp*A/E⁻ باکتری *E. amylovora* نشان دادند که آلوده‌سازی بافت‌های میزبان با این سویه سبب رسوب کالوس و بروز واکنش های مقاومت در میزبان سیب در مقابل سویه موتانت شد. بر این اساس، چنین نتیجه‌گیری کردند که پروتئین موثره DspA/E از طریق بازدارندگی سامانه دفاع اکتسابی (Systemic Acquired Resistance = SAR) وابسته به اسیدسالیسیلیک موجب به فرآهم نمودن شرایط توسعه باکتری در بافت‌های میزبان می‌شود.

نتایج حاصله از بررسی‌های انجام گرفته برروی پروتئین‌های موثره نشاندهنده تاثیر این پروتئین‌ها در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و انفجار اکسیداتیو است (Abdollahi *et al*., 2015). همچنین تاثیر کلروپلاست‌ها در حساسیت ارقام به بیماری آتشک تا حدودی به اثبات رسیده است (Erfaninia *et al*., 2014). تاثیر این پروتئین‌های موثره در القاء واکنش فوق حساسیت، انفجار اکسیداتیو، بیماری‌زایی، کانال یونی غشاء پلاسمایی، زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندریائی و بیان ژن های گیاهی وابسته به اکسایش و احیاء نیز به اثبات رسیده است. با این حال ارتباط واکنش‌های مشاهده شده در مقاومت و حساسیت به بیماری در بافت‌ها با پروتیئن‌های موثره مشخص نیست.

بنابراین این پژوهش با هدف آشکارسازی سازکارهای دفاعی میزبان در مقابل حمله عامل بیماری و به منظور تفکیک نقش هر پروتئین موثره در این برهمکنش، به جداسازی و تفکیک آثار پروتئین‌ها بر روی ساختار مقاومت ارقام به بیماری آتشک انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و سویه‌های باکتریایی

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل ارقام مختلف گلابی اروپایی (*Pyrus communis* L.) با سطوح حساسیت متفاوت به بیماری آتشک شامل رقم مقاوم درگزی، رقم نیمه متحمل هاروسوئیت (Harrow Sweet) و رقم حساس بارتلت (Bartlett) با نام معادل ویلیامز (Williams) بودند. ارقام گلابی مورد نظر از درختان بالغ و سالم مجموعه ارقام پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری موسسه تحقیقات علوم باغبانی واقع در کمالشهر کرج تهیه و در بهار سال ۱۳۹۶ در محیط درون شیشه مستقر شده بود.

به منظور استقرار مواد گیاهی در شرایط درون شیشه، نمونه‌برداری‌ها از شاخه‌های جوان بهاره انجام شد. جهت کشت، استقرار و پرآوری ریز شاخه‌ها در شرایط درون شیشه (*in vitro*)، از محیط کشت QL (Leblay *et al*.,1991) شامل یک میلی‌گرم در لیتر BAP، یک میلی‌گرم در لیتر 2iP، و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شد. برای تمامی محیط های کشت هشت گرم در لیتر آگار، ۰/۵ گرم در لیتر پکتین و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده گردید و pH محیط های کشت قبل از افزودن آگار، روی ۵/۷ تنظیم و سپس محیط ها برای مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار اتوکلاو شدند (Abdollahi *et al*., 2015). شاخه‌چه‌های ارقام مختلف گلابی، تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی با استفاده از لامپ‌های فلورسنت سفید با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر ۴۵ روز یکبار زیرکشت شدند (Abdollahi *et al*., 2015).

ارزیابی تاثیر هر یک از پروتئین های موثره

HrpN، HrpW و DspA/E روی میزبان با استفاده از مقایسه تاثیر سویه EA273 باکتری *E. amylovora* تهیه شده از کشور آمریکا (ATCCNumber-49946) به عنوان شاهد غیر جهش یافته (تیپ وحشی)، همراه با سویه‌های جهش یافته hrpN⁻، hrpW⁻ و $dspA/$E⁻ که به ترتیب در هر یک از سویه های جهش یافته، ژن‌های *hrp*N، *hrp*W و *dsp*A/E مسئول تولید پروتئین های موثره HrpN، HrpW و DspA/E خاموش شده بود، استفاده شد.

سویه های جهش یافته باکتری، از کشور فرانسه به صورت لیوفیلیز شده خریداری و براساس دستورالعمل بانک ژن باکتریایی فرانسه در حضور ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین، که با استفاده از فیلترهای ۰/۲ میکرومتر سترون و به محیط کشت اضافه شده بودند، تکثیر شدند. همچنین برای تهیه مایه تلقیح، هر یک از سویه‌های جهش یافته و شاهد مورد نیاز به صورت شب گذران در محیط کشت LB مایع، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه روی انکوباتور شیکر کشت شدند. به منظور کاهش احتمال فرار سرشاخه‌های درون شیشه از تلقیح با عامل بیماری، کدورت مایه تلقیح باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر روی عدد یک تنظیم شد.

ارزیابی برهمکنش عامل بیماری-گیاه

به منظور بررسی برهمکنش سویه‌های جهش یافته و شاهد با ارقام گلابی مورد مطالعه، شاخه‌چه‌های درون شیشه گلابی با طول حدود ۴-۲ سانتی‌متر که مدت ۴۰ تا ۴۵ روز از زیرکشت آنها گذشته بود، مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور فعال سازی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست، کلیه آزمایش‌ها، با انتقال مقدماتی نمونه ها به مدت پنج روز به محیط کشت فاقد ساکارز انجام شد (Abdollahi *et al*., 2015).

آلوده سازی شاخه‌چه‌ها در لوله‌های آزمایش ضخیم با قطر ۳۰ میلی‌متر انجام شد. به این منظور ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت QL (Leblay *et al*., 1991) فاقد ساکارز همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد ذکر شده در مرحله پرآوری مورد استفاده و سپس ۲۰۰ ماکرولیتر از مایه تلقیح از هر سویه در تیمارهای مجزا به سطح محیط کشت هر لوله آزمایش اضافه شد و سپس ساقه‌چه‌های هر رقم بر روی سطح محیط کشت استقرار داده شدند.

میزان پیشرفت نکروز در طول شاخه‌چه‌های درون شیشه با فواصل زمانی ۲۴ ساعت یکبار، و جمعاً به مدت ۷۲۰ ساعت (۳۰ روز) پس از آلوده‌سازی ارزیابی و ثبت شد. ارزیابی میزان پیشرفت نکروز به صورت درصد طول شاخه چه نکروزه براساس طول بخش نکروزه به طول کل شاخه چه محاسبه شد.

اندازه‌گیری نشت یونی نسبی

شاخص پایداری غشاء از طریق اندازه‌گیری میزان نشت یونی نسبی ریزشاخه‌های ارقام گلابی ارزیابی شد. برای این منظور ۰/۰۵ گرم بافت

ساقه پس از جداسازی برگ‌ها و سپس شستشو با آب مقطربه لوله‌هایی با حجم ۵۰ میلی‌لیترآب مقطر انتقال یافت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و شدت نورکم با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه تکان داده شدند .هدایت الکتریکی آب مقطر همراه نمونه‌ها (EC1) توسط دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. سپس لوله های آزمایش در حمام آب جوش (۱۱۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴۵ دقیقه قرار گرفتند و پس از سرد شدن EC2 آنها مجدداً اندازه‌گیری شد و در نهایت نشت یونی نسبی (EL) با معادله زیر محاسبه گردید (Sairam and Srivastava, 2001).

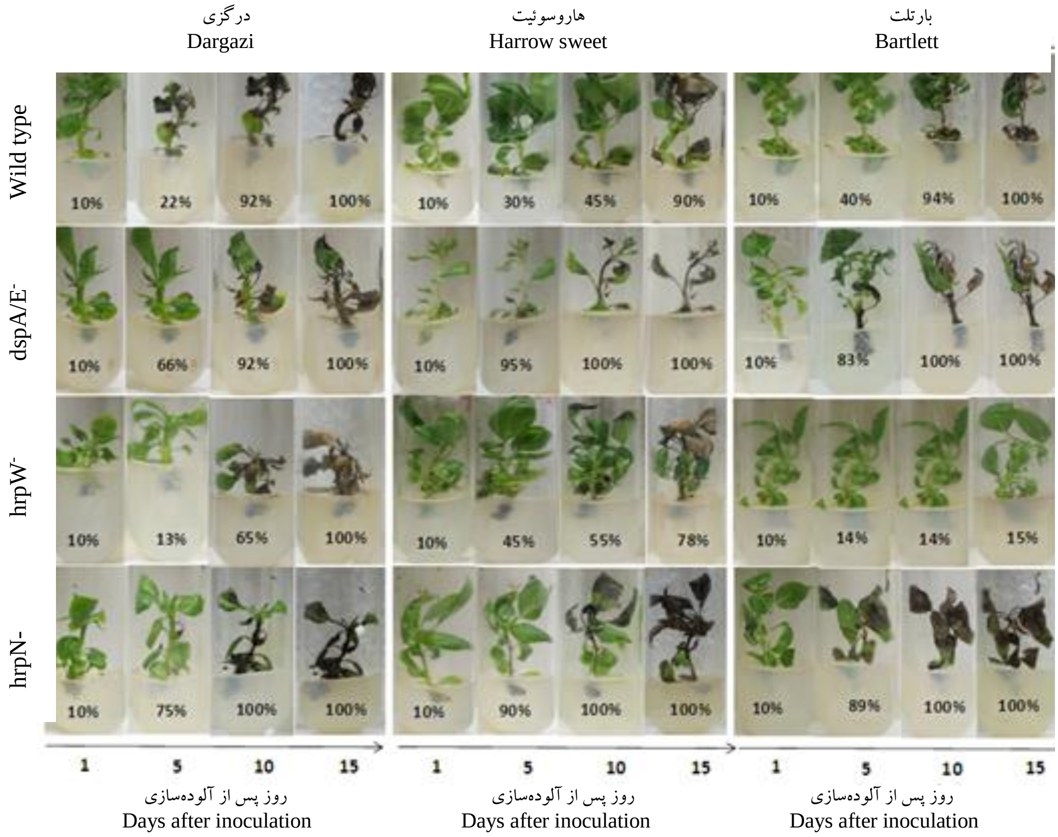
$$EL\ \% = [EC1/EC2]\times 100$$

آزمایش نکروز در پنج تکرار و آزمایش نشت یونی در چهار تکرار انجام و محاسبات آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل (Microsoft, USA- Version 2007) انجام شد.

نتایج و بحث

در این بررسی هدف ارزیابی اثر پروتئین‌های موثره باکتری *E. amylovora* شامل پروتئین‌های HrpN، DspA/E و HrpW در برهمکنش با ارقام مختلف گلابی شامل رقم مقاوم درگزی، رقم متحمل هاروسوئیت و رقم حساس بارتلت بود. این ارزیابی از طریق بررسی میزان و سرعت پیشرفت نکروز و مقایسه میزان نشت یونی نسبی بافت‌های خسارت دیده ارقام گلابی در اثر حمله عامل بیماری انجام شد. نتایج بیانگر ظهور نکروز تقریباً در تمامی نمونه های ارقام مختلف گلابی مایه‌زنی شده با سویه‌های مختلف موتانت و وحشی باکتری عامل بیماری بود (شکل ۱). همچنین در کلیه شاخه‌چه‌های ارقام شاهد که با استفاده از آب مقطر استریل مایه‌زنی شده بودند، هیچگونه علائم بروز نکروز در طول مدت آزمایش مشاهده نشد. بروز علائم نکروز در شاخه‌چه‌های مایه‌زنی شده و عدم بروز نکروز در شاخه چه های شاهد بیانگر موفقیت مایه‌زنی با استفاده از سامانه ارزیابی درون‌شیشه‌ای در هردو گروه سویه وحشی و سویه‌های موتانت باکتری عامل بیماری آتشک بود.

مقایسه زمان ظهور و سرعت پیشرفت علائم در شاخه‌چه‌های ارقام گلابی مورد بررسی با حساسیت‌های مختلف به بیماری آتشک نشان داد که اولین علائم نکروز پس از گذشت سه روز در رقم حساس بارتلت و متحمل هاروسوئیت آشکار و ظهور علائم در رقم مقاوم درگزی تا هفت روز به تاخیر افتاد (شکل ۱ و ۲). لیکن سرعت پیشرفت علائم در شاخه چه های رقم متحمل هاروسوئیت تا اندازه‌ای از رقم حساس بارتلت کم‌تر بود، به صورتی که میزان پیشرفت کامل نکروز در سرشاخه‌های رقم حساس و متحمل به ترتیب به



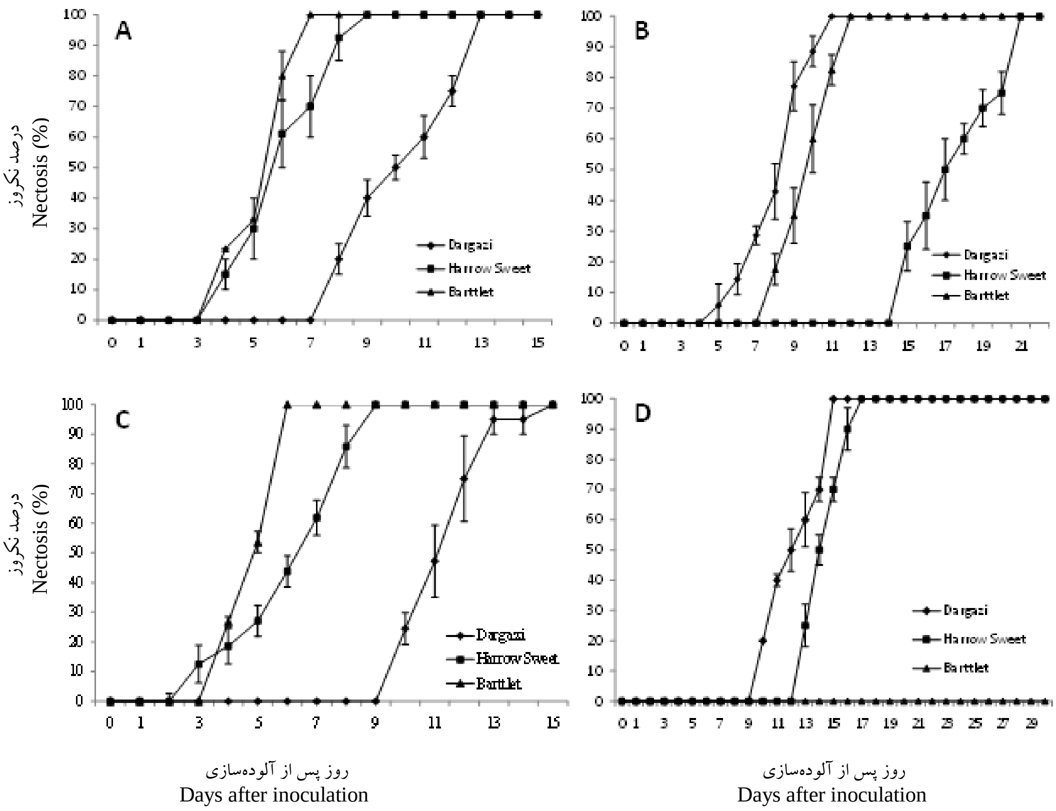
شکل ۱- مقایسه پیشرفت نکروز بیماری آتشک و درصد نشت یونی نسبی در شاخه‌چه‌های ارقام گلابی اروپایی درگزی (مقاوم)، هاروسوئیت (متحمل) و بارتلت (حساس) تحت تاثیر سویه‌های جهش یافته باکتری *Erwinia amylovora* و سویه وحشی طی زمان‌های مختلف پس از آلوده‌سازی. درصدهای بیان شده در قسمت پائینی هرشکل بیانگر میانگین میزان نشت یونی نسبی نمونه‌های مایه‌زنی شده با سویه‌های جهش یافته و وحشی عامل بیماری است.

Fig. 1. Comparison of the necrosis development and relative electrolyte leakage percentage in the European pear cultivars Dargazi (resistant), Harrow Sweet (tolerant) and Barttlet (susceptible) under the influence of mutant and wild type strains of *Erwinia amylovora* during different times after inoculation. The percentages expressed in the lower part of each figure represent the average relative electrolyte leakage of the samples inoculated with mutant and wild type strains of the causal agent of the disease.

تعداد هفت و نه روز به‌طول انجامید (شکل ۱ و ۲).

کارآئی استفاده از دو شاخص زمان بروز اولین علائم و همچنین سرعت پیشرفت نکروز برای ارزیابی مقاومت ارقام مختلف درختان میوه دانه‌دار اعم از سیب (Hassani *et al*., 2016)، گلابی (Abdollahi and Salehi, 2017) و به، با نتایج قبلی مطابقت دارد. همچنین نشانگر و موید این مطلب است که می‌توان با استفاده از سامانه درون شیشه به ارزیابی رفتار حساسیتی ارقام نسبت به بیماری آتشک و همچنین ساختارهای فیزیولوژیک آنها پرداخت (Abdollahi *et al*., 2004).

ارزیابی نشت یونی نسبی شاخه‌چه‌های درون شیشه نشان داد در شرایط قبل از مایه‌زنی، میزان نشت یونی در شاخه‌چه‌های کلیه ارقام و



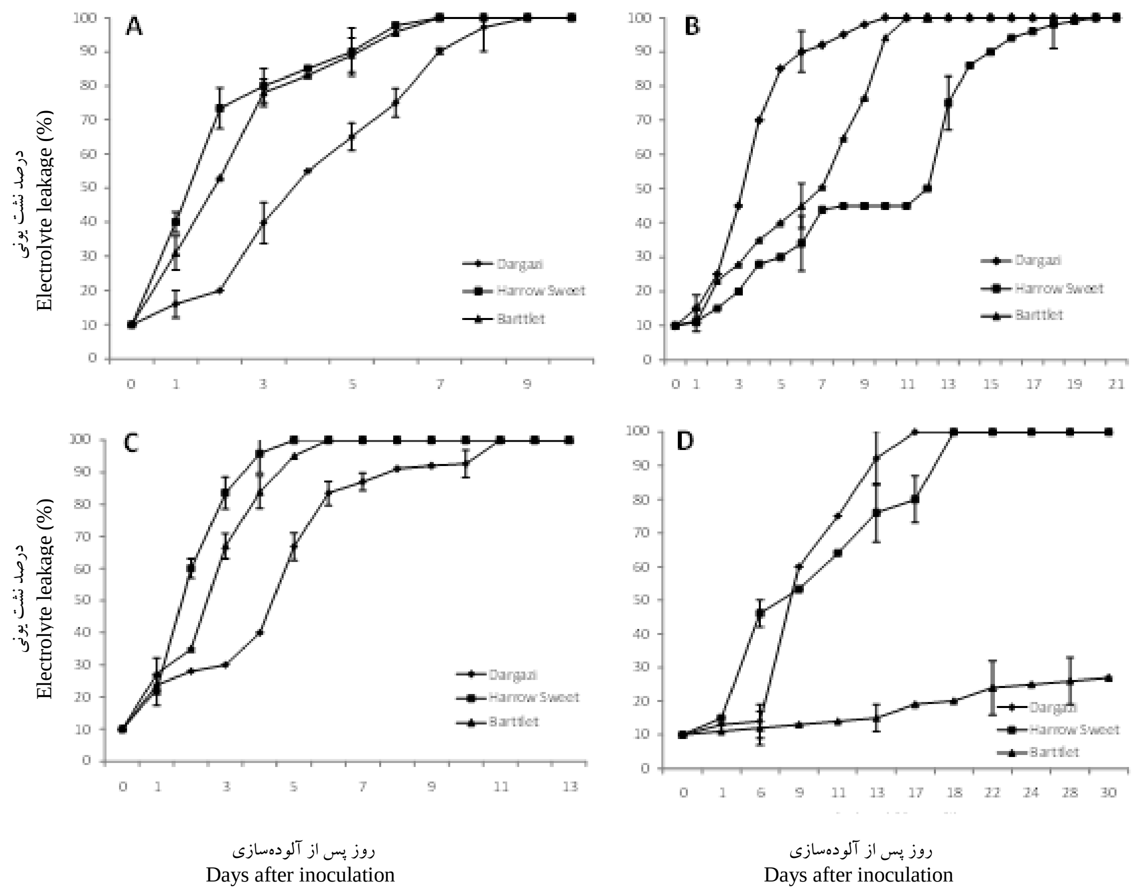
شکل ۲- مقایسه پیشرفت نکروز در طی زمان‌های پس از آلوده‌سازی ارقام گلابی با سطوح مختلف حساسیت به بیماری آتشک با سویه‌های وحشی و موتانت باکتری *Erwinia amylovora* شامل سویه غیر موتانت (A)؛ سویه موتانت *hrp*N⁻ (B)؛ سویه موتانت *hrp*W⁻ (C) و سویه موتانت *dsp*A/E⁻ (D). ارقام درگزی، هاروسوئیت و بارتلت به ترتیب به عنوان مقاوم، متحمل و حساس به بیماری استفاده شدند. ارزش‌ها به صورت میانگین پنج تکرار و خطوط روی میانگین‌ها بیانگر خطای استاندارد می‌باشد.

Fig. 2. Comparison of necrosis development after inoculation of pear cultivars with different levels of susceptibility to wild-type and *Erwinia amylovora* mutant strains: wild type (A), *dsp*A/E⁻ mutant (B), *hrp*W⁻ mutant (C), *hrp*N⁻ mutant. The values are mean of five replications and the bars are means ± standard errors.

تکرارها حدود ۱۰ درصد بود (شکل ۲ و ۳).وجود میزان اندکی نشت یونی نسبی در شرایط بودن تنش در مطالعات دیگر نیز روی بافت‌های سالم گندم (Filek *et al*., 2012)، سیب (Krasuska and Gniazdowska, 2012) و گلابی (Brisset and Paulin, 1991) گزارش شده است.

برهمکنش ارقام گلابی با سویه جهش یافته *Erwinia amylovora hrp*N⁻

شروع نکروز در ارقام گلابی درگزی، بارتلت و هاروسوئیت تیمار شده با سویه جهش یافته *hrp*N⁻ به ترتیب در روزهای چهارم، هفتم



شکل ۳- مقایسه تغییرات نشت یونی نسبی در زمان‌های پس از آلوده‌سازی ارقام گلابی با سطوح مختلف حساسیت به بیماری آتشک با سویه‌های وحشی و موتانت باکتری *Erwinia amylovora* شامل سویه غیرموتانت (A)؛ سویه موتانت *dsp*A/E- (B)؛ سویه موتانت *hrp*W- (C) و سویه موتانت *hrp*N- (D). ارقام درگزی، هاروسوئیت و بارتلت به ترتیب به عنوان مقاوم، متحمل و حساس به بیماری استفاده شدند. ارزش‌ها به صورت میانگین چهار تکرار و خطوط روی میانگین‌ها بیانگر خطای استاندارد می‌باشد.

Fig. 3. Comparison of relative electrolyte leakage changes after inoculation of pear cultivars with different levels of susceptibility to wild-type and *Erwinia amylovora* mutant strains: wild type (A), *dsp*A/E- mutant (B), *hrp*W- mutant (C), *hrp*N- mutant. The values are mean of four replications and the bars are means ± standard errors.

و چهاردهم مشاهده شد (شکل ۲-B). بر این اساس در کلیه ارقام مورد آزمایش تاخیر در بروز علائم نسبت به نمونه‌های تیمار شده با سوی غیر جهش یافته مشاهده گردید. از سوی دیگر نکته قابل توجه تسریع در بروز علائم در رقم درگزی و تاخیر آن در رقم هاروسوئیت بود.

همچنین در کلیه ارقام مورد بررسی سرعت پیشرفت نکروز یا تعداد روز لازم از زمان ظهور علائم تا کامل شدن علائم تفاوت قابل توجهی با سویه شاهد نشان نداد.

شروع نشت یونی نسبی در نمونه‌های تیمار شده با سویه جهش یافته *hrp*N-، ابتدا در رقم

درگزی و سـپس در بارتلت و هاروسـوئیت مشـاهده شـد (شـکل ۳-B). با این حال رقم درگزی و بارتلت به سرعت نشت یونی نسبی را ادامه دادند ولی در رقم هاروسـوئیت تا روز بیست و یکم ادامه پیدا کرد. این نتایج آزمایشات پیشـرفت نکروز (شـکل ۲-B) را تایید میکند. بررسـی‌های قبلی نشـان داده اسـت که پروتئین موثره HrpN دارای دو نقش تحریک سـامانه دفاع اکتسابی و بیماری‌زائی در بافت‌های میزبان می‌باشد. این پروتئین باعث تحریک ژن‌های *PR* و القاء بیان پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی در گـیاهـان شـده و از سـوی دیگر، گیاهان تراریخت ایجاد شـده با حذف توان تولید اسـید سـالیسـیلیک، قادر به ایجاد مقاومت القائی بوسـیله تیمار با HrpN نبودند (Dong *et al*., 1999).

این موضوع نشان می‌دهد که مقاومت ایجاد شـده بوسـیله پروتئین HrpN باکتری عامل بیماری، از طریق فعالسازی سامانه دفاع اکتسابی وابسته به اسید سالیسیلیک ایجاد می‌شود. تسریع در ظهور علائم نکروز و همچنین نشت یونی در رقم درگزی نشـان می‌دهد که احتمالاً در این رقم نقش تحریـک‌کننـدگی پروتئین موثره HrpN روی سامانه دفاع اکتسابی نسبت به نقش بیماری‌زائی آن برتری داشـت، به صـورتی که حذف این پروتئین موثره سبب تبدیل رقم مقاوم به بیماری درگزی به رقم بسیارحساس در مقابل سویه جهش یافته *hrp*N⁻ شد. از طرف دیگر در رقم متحمل هاروسوئیت، با در نظر گرفتن تاخیر قابل توجه در بروز علائم در مقابل سـویه جهش یافته *hrp*N⁻ در مقایسه با سویه شاهد نشان داد کـه بر خلاف رقم درگزی، در این رقم نقش بیمـاری‌زائی پروتئین موثره HrpN بر نقش تحریک‌کنندگی آن غلبه داشـت و حذف آن سبب تاخیر قابل توجه در بروز علائم شد.

برهمکنش ارقام گلابی با سـویه جهش یافته *Erwinia amylovora hrp*W⁻

شروع نکروز در ارقام گلابی مایه‌زنی شده با سویه جهش یافته hrpW⁻ در ارقام هارو سوئیت، بارتلت و درگزی بترتیب بعد از دو، سه و نه روز پس از مایه‌زنی مشـاهده شـد (شـکل ۲-C). سرعت پیشرفت نکروز در رقم بارتلت بیشتر از سـایر ارقام بود و بعد از سـه روز کامل گردید. ارقام هاروسـوئیت و بارتلت با سـرعت کمتری نکروز کامل را نشان دادند.

بررسـی نشـت یونی نسـبی در نمونه‌های مایه‌زنی شـده با سـویه جهش یافته *hrp*W⁻ تقریباً مشـابه و منطبق با سـویه شـاهد غیر جهش یافته بود (شـکل ۳-A و C) که با گزارش قبلی Venisse و همـکـاران مـطـابـقـت دارد (Venisse *et al*., 2003). مقـایسـه نتـایج آزمایشـات نکروز و نشـت یونی بوسـیله سـویه جهش یافته *hrp*W⁻ و سـویه وحشـی نشـاندهنده تفاوت‌های بسیار جزئی می‌باشد. بر این اساس به نظر می‌رسد پروتئین موثره HrpW ممکن است فاقد تاثیر و یا کمترین تاثیر را در بیماری‌زایی بـاکـتـری *E. amylovora* داشـتـه بـاشـد

(Taheri *et al*., 2017). طبق نتایج ارزیابی‌های قبلی که با استفاده از سویه جهش یافته *hrp*W⁻ انجام شده است، پروتئین HrpW نقشی در تحریک واکنش فوق حساسیت و بیماری‌زایی باکتری *E. amylovora* ندارد. با این حال طبق طاهری شهرستانی و همکاران (Taheri *et al*., 2017) و عبداللهی (Abdollahi, 2003) گزارش کرده‌اند که ممکن است این پروتئین موثره نقش محدودی در تحریک سامانه دفاع اکتسابی گیاه داشته باشد که به آزمایشات دقیقتری در این زمینه نیاز است.

برهمکنش ارقام گلابی با سویه جهش یافته *E. amylovora dsp*A/E⁻

شروع نکروز در ارقام گلابی مایه‌زنی شده با سویه جهش یافته *dsp*A/E⁻ به ترتیب بعد از ۹ و ۱۲ روز در رقم درگزی و سپس در رقم هاروسوئیت ایجاد شد (شکل ۲-D). رقم بارتلت حتی بعد از گذشت ۳۰ روز علائم نکروز را نشان نداد. سرعت پیشرفت نکروز در رقم هاروسوئیت بیشتر از رقم درگزی بود.

شروع نشت یونی نسبی در ارقام گلابی تیمار شده با سویه جهش یافته *dsp*A/E⁻ دیرتر به وقوع پیوست (شکل ۳-C). همچنین این نمونه‌ها در مدت زمان طولانی‌ری به حداکثر میزان نشت یونی نسبی رسیدند. در بین ارقام مختلف، رقم هاروسوئیت زودتر از دیگر ارقام شروع به نشت یونی نسبی کرد ولی دیرتر از آنها به حداکثر نشت یونی نسبی رسید. سپس نشت یونی نسبی در رقم درگزی شروع شد و بعد از گذشت ۱۷ روز از زمان مایه‌زنی به حداکثر میزان نشت یونی نسبی رسید. بعد از ۲۲ روز از زمان مایه‌زنی رقم بارتلت افزایش قابل توجهی در میزان نشت یونی نسبی مشاهده نشد. به نظر می رسد، افزایش نشت یونی نسبی این رقم بعد از ۳۰ روز به حدود ۲۷ درصد بدلیل اضمحلال درون شیشه‌ای گیاه طی این مدت بود.

با توجه به این نتایج، خاموش شدن ژن پروتئین موثره DspA/E تاثیر قابل ملاحظه در بیماری‌زایی پاتوژن *E. amylovora* دارد. بطوریکه در رقم بارتلت حتی بعد از گذشت یک ماه هیچگونه علائمی از شروع نکروز و نشت یونی نسبی مرتبط با بیماری مشاهده نشد. در نتیجه این یافته‌ها درخصوص رقم بارتلت تاییدکننده نتایج قبلی درخصوص عدم ایجاد بیماری توسط موتانت‌های پروتئین موثره DspA/E در گلابی می‌باشد (Bogdanove *et al*., 1998; Gaudriault *et al*., 1997).

نتایج موفقیت‌آمیز آلوده‌سازی در ارقام درگزی و هاروسوئیت نشان‌دهنده برتری سامانه درون شیشه‌ای نسبت به آلوده‌سازی شاخه و میوه گیاه می‌باشد، چون در شرایط درون شیشه‌ای شاخه‌چه‌ها به اندازه کافی تمایز نیافته و سامانه دفاعی گیاه مانند گیاهان مورد استفاده در شرایط باغ و گلخانه عمل نمی‌کند. در نتیجه نقش پروتئین موثره DspA/E در ایجاد بیماری می‌تواند بسیار مهم باشد. بر این اساس و با توجه به نتایج بررسی نشت یونی نسبی و نکروز

در این آزمایش می‌توان پروتئین موثره DspA/E را بعنوان اصلی ترین عامل بیماری‌زایی در باکتری *E. amylovora* دانست. از سوی دیگر این نتایج نشان دهنده نقش تقریباً برابر دو پروتئین موثره HrpN و DspA/E در ایجاد بیماری در رقم درگزی، نقش نسبتاً مهم‌تر پروتئین HrpN نسبت به DspA/E در رقم هاروسوئیت و نقش کلیدی و منحصر به فرد پروتئین HrpN در ایجاد بیماری در رقم بارتلت بود.

بر اساس مطالب ذکر شده نتایج نشت یونی با نکروز در انطباق بود. نشت یونی پایه در کلیه ارقام گلابی پس از یک روز از مایه زنی در حدود ۱۰ درصد بود که این میزان نشت یونی بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت قبل از ظهور علائم نکروز به شدت شروع به افزایش کرد و با مشاهده علائم نکروز به حدود ۷۰ درصد افزایش یافت. مشاهده علائم آبگز شدگی (Water soaking) در نمونه‌ها با شروع افزایش شدید نشت یونی در ارتباط بود. بر اساس نتایج ذکر شده به نظر می‌رسد پروتئین مؤثره DspA/E بیشترین تاثیر را در بیماری‌زایی داشته و نقش HrpN بیشتر تحریک سامانه دفاعی گیاه بود و نقش HrpW در بیماری‌زایی عامل بیماری بسیار ناچیز و یا فاقد اثر می‌باشد.

بررسی نتایج نکروز و نشت یونی بوسیله موتانت‌های پروتئین‌های موثره HrpN و DspA/E و مقایسه آنها با سویه وحشی باکتری عامل بیماری نشان می‌دهد، ساختار مقاومت و حساسیت به عامل بیماری در رقم مقاوم درگزی با ارقام هاروسوئیت و بارتلت متفاوت است. بر این اساس زمانی که از سویه‌های جهش‌یافته *hrp*N⁻ و *dsp*A/E⁻ برای مایه‌زنی ارقام هاروسوئیت و بارتلت استفاده شد، زمان ظهور نکروز (بیماری‌زایی) نسبت به زمانی که از سویه وحشی باکتری استفاده شده بود به تاخیر افتاد به عبارت دیگر شدت بیماری‌زایی کاهش داشت که این موضوع متاثر از تحریک سامانه دفاعی گیاه بوسیله هر یک از پروتئین‌های موثره HrpN و DspA/E به تنهایی بود. اما در رقم مقاوم درگزی زمانی که از سویه جهش‌یافته *hrp*N⁻ جهت مایه‌زنی استفاده شده بود ظهور علائم نکروز نسبت به زمانی که از سویه وحشی استفاده شده بود زودتر حادث شد و در خصوص استفاده از سویه *dsp*A/E⁻ تغییر محسوسی در زمان ظهور علائم نکروز مشاهده نشد.

آذرآبادی و همکاران (Azarabadi *et al*., 2017) در پژوهشی بر روی گونه‌های فعال اکسیژن نشان دادند ارقام گلابی از دو سازکار متفاوت برای تحمل به بیماری آتشک استفاده می‌کنند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در ساز کار اول که در رقم هاروسوئیت مشاهده شد، تولید زودهنگام و بیش از حد پراکسید هیدروژن باعث مهار بیماری شد و در سازکار دوم که در رقم درگزی مشاهده شد تلاش برای تولید بیش از حد زیاد پراکسید هیدروژن و جلوگیری از تبدیل آن به رادیکال مخرب هیدروکسیل شد. این تفاوت ساختاری

در بحث مقاومت رقم درگزی در مقایسه با سایر ارقام می‌تواند بدلیل منشـــاء متفاوت این رقم (*Pyrus communis*) و فاصـــله ژنتیکی آن با سایر ارقام گلابی باشد. در این خصوص توصیه می‌شود با استفاده از سویه‌های جهش یافته مورد اســتفاده در این پژوهش، بررســی‌های دقیق‌تری در رابطه با ساختارهای دفاعی گیاه انجام پذیرد.

با توجه به نقش کلیدی رادیکال مخرب هیدروکسیل در ایجاد ساختارهای مقاومتی ذکر شـــده، در ادامه مســـیر لازم اســـت بدین منظور بررســـی دقیق‌تر و عمیق‌تری روی ســـاختارهای تحریک کننده و یا بازدارنده تاثیر این رادیکال‌ها صـورت پذیرد. بر اســاس نتایج قبلی ارائه شــده توسط طاهری شهرستانی و همکاران (Taheri Shahrestani *et al*., 2017) و عبـدالـلهی و همـــــــــــــکــــــــــــاران (Abdollahi *et al*., 2015) مبنی بر نقش کلیدی و موثر زنجیره انتقال الکترون کلروپلاســـت در انفجار اکســـیداتیو بیماری، شـــاید ســـاختارهای مقاومتی موجود در کلروپلاست‌ها نظیر فریتین به عنوان یک پروتئین کلیدی و پوشش دهنده آهن دو ظرفیتی به عنوان بازدارنده تماس مســـتقیم پراکســـیدهیـدروژن و کاهش دهنـده تبدیل پراکســـیـد هیـدروژن بـه رادیکـال مـخرب هیدروکســیل، در کنار میزان آهن فعال بافت‌ها، یکی از گزینه‌های لازم برای بررســی‌های آتی و عمیق‌تر مقاومت به این بیماری در ارقام گلابی باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان بدینوسـیله از خانم مهندس زینب صـــالحی تکنســـین آزمایشـــگاه کشـــت بافت پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری موسسه تحقیقات علوم باغبانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری می‌کنند.

References

Abdollahi, H. 2003. Molecular biology of interaction between *Erwinia amylovora* and pear (*Pyrus communis* L.) genotypes with different susceptibility to fire blight. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Florence, Italy. 200 pp.

Abdollahi, H., and Salehi, Z. 2017. Histology of oxidative stress and generation of reactive oxygen species against progress of fire blight causal agent in pear cultivars. Seed and Plant Improvement Journal 33-2: 139-162 (in Persian).

Abdollahi, H., Ghahremani, Z., and Erfaninia, K. 2015. Role of electron transport chain of chloroplasts in oxidative burst of interaction between *Erwinia amylovora* and host cells. Photosynthesis Research 124: 231-242.

Abdollahi, H., Rugini, E., Ruzzi, M., and Muleo R. 2004. *In vitro* system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. Plant Cell Tissue and Organ Culture 79: 90-95.

Azarabadi, S., Abdollahi, H., Torabi, M., Salehi, Z., and Nasiri, J. 2017. ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L). European Journal of Plant Pathology 147: 279-294.

Bogdanove, A. J., Kim, J. F., Wei, Z., Kolchinsky, P., Charkowski, A. O., Conlin, A. K., Collmer, A., and Beer, S. V. 1998. Homology and functional similarity of an hrp-linked pathogenicity locus, *dsp*EF, of *Erwinia amylovora* and the avirulence locus *avr*E of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato. National Academy of Sciences 95: 1325-1330.

Brisset, M. N., and Paulin, J. P. 1991. Relationships between electrolyte leakage from *Pyrus communis* and virulence of *Erwinia amylovora*. Physiological and Molecular Plant Pathology 39: 443-453.

DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y.B., Nomura, K., and He, S. Y. 2004. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. National Academy of Sciences 101: 9927-9932.

Dong, H., Delaney, T. P., Bauer, D. W., and Beer, S. V. 1999. Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. Plant Journal 2: 207-215.

Erfaninia, K., Abdollahi, H., and Khosroshahli, M. 2014. Effect of several chloroplast electron transport chain inhibitors on interaction of *Erwinia amylovora* with susceptible and tolerant apple and pear cultivars. Plant Pathology 49: 201-214. (in Persian).

Filek, M., Walas, S., Mrowiec, H., Rudolphy-Skorska, E., Sieprawska, A., and Biesaga-Koscielniak, J. 2012. Membrane permeability and micro and macro element accumulation in spring wheat cultivars during the short-term effect of salinity- and PEG-induced water stress. Acta Physiologiae Plantarum 34: 985-995.

Gaudriault, S., Malandrin, L., Paulin, J. P., and Barny, M.-A. 1997. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of

Pseudomonas syringae, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB dependent way. Molecular Microbiology 26: 1057-1069.

Hassani, M., Salami, S. A., Nasiri, J., Abdollahi, H., and Ghahremani, Z. 2016. Phylogenetic analysis of *PR* genes in some pome fruit species with the emphasis on transcriptional analysis and ROS response under *Erwinia amylovora* inoculation in apple. Genetica 144: 9-22.

Holtappels, M., Noben, G. P., Van Dijck, P., and Valcke, R. 2018. Fire blight host-pathogen interaction: proteome profiles of *Erwinia amylovora* infecting apple rootstocks. Scientific Reports 8: 11689.

Krasuska. U., and Gniazdowska, A. 2012. Nitric oxide and hydrogen cyanide as regulating factors of enzymatic antioxidant system in germinating apple embryos. Acta Physiologiae Plantarum 34: 683-692.

Leblay, C., Chevreau, E., and Robin, L. M. 1991. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivar (*Pyrus communis* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25: 99-105.

Narayanasamy, **P. 2008.** Molecular biology in plant pathogenesis and disease management: disease management. Springer. 246 pp.

Oh, C. S. 2005. Characterization of HrpN-interacting proteins from plants, the Hrp pathogenicity island of *Erwinia amylovora*, and its proteins that affect the hypersensitive response. Ph.D. Cornell University, Ithaca, NY. 334 pp.

Oh, C. S., Kim, J. F., and Beer, S. V. 2005. The Hrp pathogenicity island of *Erwinia amylovora* and the identification of three novel genes required for systemic infection. Molecular Plant Pathology 6: 125-138.

Oh, C. S., and Beer, SV. 2005. Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. Federation of European *Microbiological* Societies Microbiology Letters 253: 185-192.

Sairam, R. K., and Srivastava. G. C. 2001. Water stress tolerance of wheat *Triticum aestivum* L.: Variation in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotype. Journal of Agronomy and Crop Science 186: 63-70.

Taheri Shahrestani, A., Abdollahi, H., Yakhchali, B., Mehrabi, R., and Eini Gandomani, O. 2017. Comparison of the effects of *Erwinia amylovora* effector

proteins on pear cultivars in active and inactive chloroplastic electron transport chain conditions. Modern Genetics Journal 3: 333-345.

Van der Zwet, T., and Keil, H. L. 1979. Fire blight: A bacterial disease of rosaceous plants. Handbook No. 510. United State Department of Agriculture. Washington DC, USA. 211 pp.

Vanneste, J. L. 2000. Fire Blight: The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 370 pp.

Venisse, J. S., Barny, M. A., Paulin, J. P., and Brisset, M. N. 2003. Involvement of three pathogenicity factors of *Erwinia amylovora* in the oxidative stress associated with compatible interaction in pear. FEBS Letters 537: 198-202.

Venisse, J. S., Gullner, G., and Brisset, M. N. 2001. Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. Plant Physiology 125: 2164-2172.

Xie, Z., and Chen, Z. 2000. Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 183-190.